

Az érfal trombogenitása és hatása a trombolizisre

(OTKA 60123 sz. projekt zárójelentése)

A kutatási tervnek megfelelően munkánk két főterületre fókuszált: az érfal – vérsejt interakciók szerepére a trombus keletkezésében és az így alakuló véralvadék litikus érzékenységére. A kutatás alapkoncepcióját alátámasztó irodalmi előzményeket egy összefoglaló cikkben közzétettük (1, a szerző Dr. Wohner Nikolett a projekt első két évében a projekt alkalmazásában állt).

Az érfal trombogenitását tekintve az első célkitűzésünk a nagyartériák media rétegének relatív tromboerezisztenciájának jellemzése volt. Munkánk előtt ismert volt, hogy nagy nyírási sebesség mellett a vérlemezkék von Willebrand faktor (VWF) dependens adhézioja elsősorban az adventitia rétegben történik, míg a natív media szerkezete gyengén vonzza a trombocitákat. Ezt a szituációt modelleztük in vitro áramlási kamrában, ahol fagyasztva metszett érfal (humán a. iliaca) fölött 3350 s^{-1} nyírási sebességgel teljes vért áramoltattunk és a vérlemezkék adhézióját detektáltuk a GpIIb/IIIa antigén indirekt immunfluoreszcens kimutatásával (2). Az érfal egyes rétegeinek vérlemezkével lefedett területaránya számszerűen jellemzi az adott réteg trombogenitását. E paraméter változását követtük neutrofil granulocitákkal történő kezelés után. A stimulált neutrofil leukociták által szecernált enzimeket aktivitásméréssel és immunoblottal azonosítottuk. Stimulált neutrofilek hatására a media trombogenitása kb. 10-szeresére nő a kontroll értékhez képest. A granulociták szerin-proteázokat (elasztáz, katepszin G) illetve mátrix metalloproteinázokat (MMP-8, MMP-9) szecernálnak. A fehérvérsejteknek az érfal trombogenitására gyakorolt hatása széles spektrumú szerin-proteáz vagy MMP inhibitor mellett csökken, illetve a két inhibitor kombinációjával teljesen felfüggeszthető. Ugyanakkor ez a hatás izolált elasztáz, trombin, MMP-8 és MMP-9 kezeléssel is reprodukálható. Ezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a neutrofil-adhézió és aktiváció következtében az érfal szerkezete proteolitikusan megváltozik úgy, hogy több vérlemezke tapad a media réteghez. E hatásért legalább részben a neutrofil eredetű elasztáz, MMP-8 és MMP-9 felelős. Az érfal szerkezeti átalakulását atomi erő mikroszkóppal (AFM) és pásztázó

elektronmikroszkóppal (SEM) vizsgáltuk. Munkánk ez a része megerősítette, hogy a neutrofil leukocitákhoz kapcsolódó proteolízis eltávolítja a media réteg finom proteoglikán hálóját és hozzáférhetővé tesz VWF kötőhelyeket a kollagénben, ezzel növelve az érfal trombogenitását.

Magas nyírási sebesség mellett a vérlemezke-dús trombus kialakulása mind fibrinogént, mind VWF-t igényel és ezek jelenléte befolyásolhatja később a trombus oldását. A VWF fibrinolízis-modulátor szerepének tisztázására kötődési és kinetikai vizsgálatokat végeztünk (3). Megállapítottuk, hogy a plazmin kötődik VWF-hoz, még hozzá a plazminogén, plazmin és az aktív centrumban blokkolt plazmin hasonló egyensúlyi állandója alapján ez a kötődés nem az aktív centrumon keresztül történik. VWF fiziológiás koncentrációi mellett a fibrinogén plazminnal történő emésztése lelassul és ennek következtében VWF mellett a fibrinogén alvadék-képző képessége jobban ellenáll a plazmin hatásnak. Ugyanakkor maga a VWF nem emésztődik plazmin hatására fibrinogén jelenlétében. Meghatároztuk a plazmin, miniplazmin és mikroplazmin kinetikai paramétereit a fibrinogén lebontásában és megállapítottuk, hogy a VWF nem módosítja a vizsgált proteázok K_m értékeit, míg a k_{cat} csökken növekvő VWF koncentráció mellett. Így a fibrinogén degradációban a VWF hatása non-kompetitív gátlásként értelmezhető, amelynek az egyensúlyi gátlási állandói a VWF fiziológiás plazmakoncentráció tartományába esnek (5.4 $\mu\text{g/ml}$, 5.7 $\mu\text{g/ml}$ és 10.0 $\mu\text{g/ml}$ plazmin, miniplazmin és mikroplazmin esetében). Ezek az értékek arra is utalnak, hogy a plazmin és miniplazmin szerkezetében jelen levő kringle 5 domén modulátor szerepet játszik a VWF és a proteázok kölcsönhatásaiban, bár nem ez az elsődleges VWF kötőhely. A VWF nem befolyásolta sem a plazmin amidolitikus aktivitását szintetikus szubsztráton (Spectrozyme-PL), sem proteolitikus aktivitását fibrinen. Munkánk ez a része tisztázta, hogy bár a VWF gyenge szubsztrátja a plazminnak, fiziológiás koncentrációban védőhatást gyakorol a fibrinogén plazminnal történő emésztésében és így hozzájárul a vérplazmában levő fibrinogén alvasztó képességének megőrzésében és adhézíós szerepének fenntartásában a vérlemezke-dús trombusokban.

A trombus kialakulásának kezdeti szakaszában a neutrofil leukociták interakciói az érfal egyes komponenseivel hozzájárulnak a trombogenezishez. Későbbi stádiumban viszont neutrofil elasztáz tartalmuknak köszönhetően fibrinolitikus hatásuk kerül előtérbe. Munkánk következő fázisában kvantitatív *in vivo* bizonyítékokat kerestünk a neutrofilek szerepére az obliteratív artériás trombusok feloldásában (4). Ehhez 28 beteg műtétielt eltávolított trombusait használtuk fel. Az ezekből készült metszeteken indirekt immunfluoreszcenciával kimutattuk az elasztáz-specifikus fibrin degradációs termékeket (NE-FDP), a vérlemezke tartalmát (GpIIb/IIIa antigén alapján) és a fibrin tartalmát, valamint ezzel párhuzamosan DNS festéssel a leukocita tartalmát. A digitalizált fluoreszcens mikroszkópos képek színcsatornáit szétválasztottuk, az integrált intenzitás-értékek alapján meghatároztuk a vizsgált trombuskomponensek mennyiségét és statisztikai módszerekkel (korrelációanalízis, hierarchikus agglomeratív klaszteranalízis, Hotelling's T^2 és F-statisztika) értékeltük. Szignifikáns ($p=0,00002$) Pearson korrelációs koefficiens (értéke 0,71) alátámasztotta a trombusok NE-FDP és a leukocita tartalma közötti asszociációt. A klaszteranalízis két trombusosztályt igazolt az NE-FDP, leukocita és vérlemezke tartalom alapján és szintén két osztályt az NE-FDP, leukocita és fibrin tartalom alapján. Ha a trombusok NE-FDP, fibrin és vérlemezke tartalmát normalizáljuk a leukocita tartalmuk szerint, egy trombocita-függő trombolitikus rezisztenciával rendelkező klaszter azonosítható (fordítottan arányos NE-FDP és vérlemezke tartalommal), egy másik pedig előrehaladott sejt-függő trombolízissel jellemezhető (fordítottan arányos NE-FDP és fibrin tartalommal). Munkánk ez a része igazolta, hogy *in vivo* a trombociták alvadék-stabilizáló szerepet játszanak a leukocita-függő trombolízisben, amely hasonlít a korábban leírt szerepükre a plazmin-függő fibrinolízisben.

A kutatási projekt második fókusza a már kialakult trombus egyes komponenseinek (fehérjék, lipidek) a plazminogén/plazminogén-aktivátor rendszer működésére gyakorolt hatása volt. Ezen belül először *ex vivo* és *in vitro* adatokkal támasztottuk alá a szabad zsírsavak (mint a foszfolipidek egyik lebontási terméke) szerepét a fibrinolízis különböző szakaszaiban (plazminogén-aktiváció, plazminaktivitás) (5). Fluoreszcens próbával a szabad zsírsavakat millimoláris

koncentrációkban mutattuk ki sebészileg eltávolított humán trombusokban. *In vitro* méréseinkben olajsavval modelleztük a zsírsavak hatását a fibrinolízisre. Az olajsav (0,1 mM-os koncentrációban) a plazmin amidolitikus aktivitását több, mint 90%-kal csökkenti szintetikus szubsztráton, de csak részlegesen gátolja annak fibrinolitikus aktivitását. A plazminogén szöveti típusú plazminogén-aktivátorral (tPA) indukált aktivációját az olajsav oldatban teljesen felfüggeszti, míg fibrinfelszínen gyorsítja. A vad típusú tPA-hoz képest a tPA egyik rekombináns származéka (retepláz) magasabb fibrin specificitást mutat olajsav jelenlétében: kisebb olajsavkoncentráció mellett a plazminogén-aktiváció oldatban teljesen gátolt, míg fibrinfelszínen erősebben fokozódik. A zsírsavak általunk leírt hatásai egy új mechanizmust jelentenek, amellyel hozzájárulnak a plazminogén/plazminogén-aktivátor rendszer fibrin specificitásához: azon túl, hogy a plazminogén-aktivációt stimulálják a fibrinhálóban és ugyanakkor a plazmint és a plazminogén-aktivátorokat gátolják oldatban, a zsírsavak feloldják a foszfolipidek által létrehozott fibrinolitikus barriert.

Az előzőekben részletezett zsírsavhatások pontos jellemzésére további vizsgálatokat végeztünk (6). Mivel a vérlemezke membrán foszfoglicerolipideiben előforduló zsírsavak 22, 20, illetve 19 %-a arachidonsav, sztearinsav, illetve olajsav indokoltnak látszott e három zsírsav hatásainak összehasonlítása. A gátlástípus jellemzéséhez a Spectrozyme-PL szubsztráton végzett mérést választottuk, mert a fibrintől eltérően csak egy kötés hidrolízise történik (tehát a meghatározott kinetikai paramétereknek közvetlen fizikai jelentésük is van) és az egyik terméknek, a *p*-nitroanilinnak (pNA) a magas extinkciós együtthatója miatt a mérés sokkal érzékenyebb a plazmin aktivitásváltozásaira mint a fibrinoldás követése. A vizsgált reakciók jellemzői folyamatgörbe-analízist tettek szükségessé, amihez új analizáló programot kellett kidolgozni. Önmagában is ez a kinetikai szoftver újdonságot jelent: a számítástechnika mai fejlettségi szintje mellett minden kutató számára elérhető számítógépen elfogadható gépidőn belül a kísérlet valódi tartalmának megfelelő kinetikai paramétereket azonosít. Eljárásunk nem reakciósebességi állandókkal operál, hanem az alkalmazott modellben általuk képzett arányszámokkal, amelyekre a mérés valóban érzékeny. Továbbá a Monte Carlo szimulációnak köszönhetően nemcsak a paraméterek becsült értékét, hanem azok statisztikai

eloszlását is meghatároztuk, ami hűen tükrözi a kísérletből adódó szórást. Mindhárom vizsgált zsírsav 10 – 20-szoros emelkedést okoz a plazmin K_m értékében. Az oleát és arachidonát 10 – 65 μM koncentráció tartományban hatásos, míg a sztearát 65 μM feletti koncentrációban fejt ki szignifikáns hatást. A két telítetlen zsírsav (oleát és arachidonát) emellett a katalitikus állandó 2-szeres csökkenését is okozza, így kevert-típusú inhibitorként viselkedik. A sztearát hatása viszont szokatlan: a Michaelis állandó növekedéséhez a katalitikus állandó növekedése társul, ami telítő szubsztrát koncentrációk mellett látszólagos aktivátor hatásként jelentkezik. Ha viszont a k_p/K_m arányt értékeljük a sztearát is plazmin inhibitornak tekinthető, amelynek hatékonysága a legalacsonyabb a három vizsgált zsírsav közül. A zsírsavak célpontját a plazmin molekulán belül úgy közelítettük meg, hogy különböző fokban csonkított plazmin származékok amidolitikus aktivitását vizsgáltuk zsírsavak jelenlétében. A miniplazmin (des-kringle₁₋₄ plazmin) az 5. kringle és a katalitikus doménből áll, míg a mikroplazmin (des-kringle₁₋₅ plazmin) csak a katalitikus domént tartalmazza. A Spectrozyme-PL telítő koncentrációinál mindhárom zsírsav úgy befolyásolja a miniplazmin aktivitását mint a plazminét: látszólagos aktiválás figyelhető meg sztearát mellett valamint gátlás oleát és arachidonát mellett. A mikroplazmin viszont nem érzékeny a zsírsavakra. Ez az eredmény kizárja a katalitikus domént mint a zsírsavak támadási pontja és amellet szól, hogy az 5. kringle jelenléte elegendő hatásuk kifejtéséhez. A zsírsavak jelenlétében végzett enzimkinetikai vizsgálataink azt az általános lehetőséget szemléltetik, hogy egy regulátor képes az enzim kinetikai paramétereit egymástól függetlenül és ráadásul ellentétes irányba változtatni. Így az enzimaktivitás tekintetében a regulátor összhatása eltérhet a szubsztrát koncentráció függvényében. Ez az eredmény még egyszer aláhúzza azt a fontos módszertani követelményt, hogy folyamat-görbe analízisnél is csak széles skálán változtatott szubsztrát és regulátor koncentrációkkal végzett mérések alapján, megfelelő modell-elkülönítéssel és statisztikai feldolgozással lehet megbízható kinetikai paramétereket nyerni. Ennek módszertani jelentőségét külön közleményben tárgyaltuk (7) valamint heterogén rendszerre kiterjesztett változatát is közöltük (8).

Az általunk korábban közölt *in vitro* foszfolipid hatások patofiziológiai jelentőségét közelítettük meg munkánk antifoszfolipid szindrómában (APS) szenvedő betegekre kiterjedő részében (9). Mivel mind az immunoglobulin G (IgG), mind a foszfolipidek befolyásolják a fibrinolízist, ezek együttes hatását vizsgáltuk a fibrinolízis egyes lépéseit (tPA diffúziója a fibrin gélbe, plazminogén aktiváció a fibrin felszínen, fibrin oldása plazminnal) modellező kísérleti rendszerekben egészséges személyek és APS betegek vérplazmájából izolált IgG és szintetikus foszfolipidek (foszfatidilkolin és foszfatidil szerin keveréke) jelenlétében. A normál IgG fokozta a fibrinbe zárt foszfolipid barrier funkcióját a tPA diffúzió és plazminogén aktiváció tekintetében, de nem befolyásolta a plazmin-katalizálta fibrinoldást. A vizsgált APS-IgG-k egyike szintén korlátozta a tPA diffúziót, de felgyorsította a plazminogén aktivációt fibrin felszínen és gátolta plazmin-katalizálta fibrinoldást. Egy másik APS-IgG, amely nem befolyásolta szignifikánsan a tPA penetrációját a fibrinbe és a plazminogén aktivációt sem, részben képes volt ellensúlyozni a foszfolipid gátlóhatását a plazmin képzésre és felgyorsította a foszfolipid tartalmú fibrin oldását. Az APS betegekből izolált IgG-k hatásai a fibrinolízisre eltértek a normál IgG-vel megfigyeltektől, de az eltérések nem mutattak konzekvens mintázatot. Így vizsgálataink magas fokú heterogenitásra utalnak a patológiás IgG-k pro- és anti-fibrinolitikus hatásainak tekintetében, ami összefüggésbe hozható az APS betegeknél megfigyelhető trombotikus tünetek változatosságával.

Jelenleg két olyan közleményünk áll elbírálás alatt, amely a fibrin általunk morfometriával jellemzett szerkezeti változatainak litikus érzékenységevel foglalkozik. Ezek közül a most közlés alatt álló eredményeink közül kiemelném azt a megállapításunkat, hogy a fibrin oldása során a fibrinháló átrendeződése következtében intermolekuláris β -lemez szerkezetek keletkeznek. Ennek jelentőségére már a projekt első évében közölt vizsgálatunk utalt, amely kimutatta, hogy a kofaktor molekulák aggregációja szükséges a hatékony templát létrehozásához a tPA-indukálta plazminogén aktiváció során (10). Akkori hő-denaturált humán szérum albumin alapú modellünk igazolta, hogy a kofaktor részecskék 10 nm fölötti átmérője és β -lemez szerkezetük kedvez a templát

funkciónak. Későbbi munkánk alátámasztotta e jelenség relevanciáját az intravaszkuláris trombolízisben.

Összefoglalva elmondható, hogy a tervezett kutatás fő célkitűzéseit megvalósítottuk. Eredményeink, amelyeket 10 teljes terjedelmű tudományos cikkben (összesített impakt faktoruk 27), 1 könyvfejezetben és 13 hazai és nemzetközi konferenciaelőadáson mutattunk be, alapul szolgálhatnak a trombusszerkezethez igazított trombolitikus eszközök tervezéséhez és fejlesztéséhez.

A projekt támogatásával megjelent teljes terjedelmű közlemények

1. Wohner N. Role of cellular elements in thrombus formation and dissolution. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2008; 6: 224-228.
2. Wohner N; Keresztes Z; Sótónyi P; Szabó L; Komorowicz E; Machovich R; Kolev K. Neutrophil granulocyte-dependent proteolysis enhances platelet adhesion to arterial wall under high-shear flow. *J Thromb Haemost.* 2010; 8: 1624-1631.
3. Tanka-Salamon A; Kolev K; Machovich R; Komorowicz E. Proteolytic resistance conferred to fibrinogen by von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 2010; 103: 291-298.
4. Rábai G; Szilágyi N; Sótónyi P; Kovalszky I; Szabó L; Machovich R; Kolev K. Contribution of neutrophil elastase to the lysis of obliterative thrombi in the context of their platelet and fibrin content. *Thromb Res* 2010; 126: *in press*. DOI 10.1016/j.thromres.2010.05.007
5. Rábai G; Váradi B; Longstaff C; Sótónyi P; Kristóf V; Timár F; Machovich R; Kolev K. Fibrinolysis in a lipid environment: modulation through release of free fatty acids. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1265-1273.
6. Tanka-Salamon A; Tenekedjiev K; Machovich R; Kolev K. Suppressed catalytic efficiency of plasmin in the presence of long-chain fatty acids. Identification of kinetic parameters from continuous enzymatic assay with Monte Carlo simulation. *FEBS J* 2008; 275: 1274-1282.
7. Nikolova N; Tenekedjiev K; Kolev K. Uses and misuses of progress curve analysis in enzyme kinetics. *Cent Eur J Biol* 2008; 3: 345-350.
8. Tenekedjiev K; Váradi B; Kolev K. Identification of the kinetic parameters of a protease in the dissolution of fibrin-myosin clots. *C R Acad Bulgare Sci* 2006; 59: 1067-1074.
9. Gombás J; Tanka-Salamon A; Skopál J; Nagy Z; Machovich R; Kolev K. Modulation of fibrinolysis by the combined action of phospholipids and immunoglobulins. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008; 19: 82-88.
10. Galántai R; Módos K; Fidy J; Kolev K; Machovich R. Structural basis of the cofactor function of denatured albumin in plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Biochem Biophys Res Comm* 2006; 341: 736-741.